

grosses

Lane

LUDWIG RIST

**Züchtungsversuche von Tuberkel-
bakterien mit dem Wärme-Säure-
Vorbehandlungsverfahren nach
Hedderich**

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

*Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Hochschule in Gießen*

Direktor : Prof. Dr. H. Keller

Züchtungsversuche von Tuberkelbakterien mit
dem Wärme-Säure-Vorbehandlungsverfahren
nach Hedderich

INAUGURAL-DISSERTATION

*zur Erlangung des Doktor-Grades der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen*

Eingereicht von

LUDWIG RIST

Tierarzt

aus Nanten/Siebenbürgen

Gießen 1954

Buchdruckerei Michael Laßleben Kallmünz über Regensburg

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Hochschule Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Keller

Berichterstatter: Professor Dr. H. Keller

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 1953

Dem Andenken meiner lieben verstorbenen Frau!



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	7
B. Schrifttum — Der Nachweis des Tuberkelbakteriums	8
1) Der mikroskopische Nachweis	8
2) Der Tierversuch	8
3) Die Kultur	9
a) Die Entwicklung des Nährbodens	9
b) Die Entwicklung der Vorbehandlung	10
C. Eigene Untersuchungen	15
1) Auftrag	15
2) Untersuchungsmaterial	15
3) Mikroskopische Untersuchung	15
4) Kulturverfahren	18
5) Überprüfung der gewachsenen Kolonien	23
a) mikroskopisch	23
b) kulturell	23
c) durch den Tierversuch	23
D. Zusammenfassung	27
E. Literaturverzeichnis	28
F. Lebenslauf	32

A. Einleitung

Die Züchtung von Tuberkelbakterien aus verdächtigem Material hat verschiedene Schwierigkeiten. Diese werden hervorgerufen einmal durch die hohen Ansprüche der Tuberkelbakterien an ihren Nährboden, zum anderen aber durch die abzutötenden Begleitbakterien. Seit der Entdeckung des Tuberkelbakteriums und seiner Reinzüchtung auf erstarrtem Blutserum durch Robert Koch wurde der Nährboden ständig verbessert und schließlich auch für die Zwecke der bakteriologischen Routine-Untersuchung brauchbar. Ziel der Entwicklung war, das für die Tuberkelbakterien beste Milieu zu schaffen, damit die Kolonien in frühester Zeit sichtbar wurden. Die Verbesserung des Nährbodens allein genügte aber nicht, um die Kultur des Tuberkelbakteriums zu ermöglichen, es mußten auch Wege gefunden werden, die hinderlichen Begleitbakterien auszuschalten. Es wurden u. a. auch Säuren herangezogen. Diese töteten die Begleitbakterien zwar ab, beeinträchtigten jedoch auch die Tuberkelbakterien in ihrer Lebensfähigkeit und Wachstumsfreudigkeit. Um diesen Nachteil auszugleichen, wurde die Säurekonzentration verringert. Sie durfte jedoch eine gewisse Stärke nicht unterschreiten, da sonst die Begleitbakterien nicht ausgeremert wurden. Hedderich und Breul haben nun durch die kombinierte Anwendung von Wärme und Säure einen Weg gewiesen, der die Begleitbakterien abtötet und die Tuberkelbakterien weitgehend schont.

Ziel meiner Arbeit ist, dieses neue Verfahren an tuberkulösen Lymphknoten und Organmaterial zu erproben. Weiteren Untersuchungen wird es vorbehalten bleiben, den Nährboden und die Vorbehandlung so zu verbessern, daß schließlich durch den Kulturversuch die sichere Diagnose ermöglicht wird, ob in dem zu untersuchenden Material das *Mycobacterium tuberculosis* vorliegt.

B. Schrifttum — Der Nachweis des Tuberkelbakteriums

Der Nachweis der Tuberkelbakterien aus verdächtigem Material kann mikroskopisch, kulturell und durch den Tierversuch erfolgen.

1) Der mikroskopische Nachweis

Die mikroskopische Untersuchung birgt erhebliche Fehlerquellen in sich. Diese Fehlerquellen sind gegeben

- 1.) dadurch, daß die Tuberkelbakterien sich nach der üblichen Färbemethode (Ziehl-Neelsen) nicht immer als alkohol- und säurefeste Stäbchen erweisen, eine Tatsache, worauf Hutyra-Marek-Manninger, Reiner Müller, Steigner, Buss u. a. hinweisen;
- 2.) daß die Tuberkelbakterien in dem Material nur in geringer Menge vorhanden sein können und der Untersuchung entgehen. Für die Milchuntersuchungen ist ein Versagen der mikroskopischen Untersuchung von Hohn, Schrader und Munz mit ungefähr 40% angegeben;
- 3.) daß der Nachweis von alkohol- und säurefesten Stäbchen kein Beweis ist für das Vorhandensein von *Mycobacterium tuberculosis*, da auch apathogene Mykobakterien (*Laktikola* und *Phlei*) sich nach Ziehl-Neelsen rot färben und zu Fehldiagnosen Anlaß geben.

Wenn trotzdem der mikroskopischen Untersuchung den beiden anderen Verfahren gegenüber der Vorzug gegeben wird, so ist dies darin begründet, daß der Kultur- und Tierversuch mindestens 6 Wochen in Anspruch nehmen.

2) Der Tierversuch

Der Tierversuch ist die sicherste Methode zum Nachweis von Tuberkelbakterien aus verdächtigem Material. Es ist dabei notwendig, daß mehrere Versuchstiere (Meerschweinchen) beimpft werden, da es vorkommen kann, daß das eine oder andere Versuchstier interkurrent stirbt oder bei geringem Tuberkelbakteriengehalt des Untersuchungsmaterials nicht infiziert wird. Auf diese Notwendigkeit weisen Viatschko, Buss und Lang und Seelemann hin. Die Versuchsdauer beträgt bei Verwendung von Meerschweinchen mindestens 6 Wochen. Die Möglichkeit, daß man durch Tuberkulinisierung nach etwa 3 Wochen auf eine tuberkulöse Infektion des Versuchstieres schließen kann, ist nur bedingt, da nach Russeff auch bruzellainfizierte Meerschweinchen auf Tuberkulin positiv reagieren können, ein Umstand, den auch Mitscherlich bejaht. Die Exstirpation der geschwollenen Lymphknoten der Meerschweinchen mit anschließender mikroskopischer

Untersuchung auf alkohol- und säurefeste Stäbchen kann ebenfalls zu Irrtümern Anlaß geben, da nach Bergey's Manual auch das Mycobacterium phlei eine Abszeßbildung verursachen kann.

Aufgrund dieser Tatsachen — Unzuverlässigkeit des mikroskopischen Nachweises und lange Dauer des Tierversuchs — befaßt man sich bereits seit längerem mit dem züchterischen Nachweis der Tuberkelbakterien.

3) Die Kultur

a) Die Entwicklung des Nährbodens

Zur Züchtung von Tuberkelbakterien verwendete Robert Koch bei 55° erstarrtes Serum von Rinder- oder Schafblut und fand damit einen Nährboden, der das Wachstum der Tuberkelbakterien in brauchbarer Weise förderte. Nocard und Roux haben dem erstarrten Rinder- und Schafblutserum 6% Glycerin hinzugegeben und erzielten dadurch ein besseres und schnelleres Wachstum der Tuberkelbakterien. Das Glycerin diente dabei nicht nur zur Verhütung der Austrocknung des Nährbodens, sondern auch als Kohlenstoffquelle, wie Proskauer und Beck feststellten.

Pawlowsky verwendete Kartoffelscheiben, die später mit Glycerin und Wasser getränkt wurden und bis 1920 zur Züchtung von Tuberkelbakterien Verwendung fanden.

Anzilotti erzielte auf den in sodaalkalischem 6%igem Glycerinwasser gekochten Kartoffelstücken schon am 4. bis 5. Tag sichtbare und am 15. Tage üppige Kolonien.

Capaldi setzte dem Agar- und Bouillonnährboden Eigelb zu.

Dorset stellte 1902 einen festen Einährboden her, indem er koagulierte Eimasse dem Nährboden zusetzte, und fand, daß die Tuberkelbakterien üppiger wuchsen als auf dem Nährboden, dem koaguliertes Eigelb zugesetzt war. Bei alleinigem Zusatz von Eiweiß konnte er kein Wachstum erzielen. Die beimpften Röhrchen verschloß er mit Paraffin.

Lubénau untersuchte Nährbodenzubereitungen und fand, „daß eine koagulierte Mischung von gleichen Teilen Eigelb und 3%iger Glycerinbouillon bequemere und schneller ergebige Ernten brachte als die bekannte Glycerinbouillon-Schwimmkultur.“

Besredka empfahl eine Eibouillon, bei der das Pepton fortgelassen wurde.

Petroff setzte seinem Kalbfleischbouillon-Ei-Glycerin-Nährboden Gentianaviolett zu. Er erhoffte durch den Zusatz von Gentianaviolett eine Hemmung der Begleitbakterien zu erreichen und wurde in seiner Annahme nicht getäuscht.

Petragnani fügte 1915 seinem Nährboden Eimasse, Kartoffeln, Glycerin, Pepton, Vollmilch und zur Hemmung der Begleitbakterien

Malachitgrün in einer Konzentration von 1:4000 hinzu. Dieser Nährboden fand in allen Instituten weitgehende Anwendung und wird auch heute noch in verschiedenen Modifikationen gebraucht.

Sonnenschein konnte die Begleitbakterienflora schon mit einem Malachitgrünzusatz von 1:5000 hemmen und gutes Tuberkelbakterienwachstum erzielen.

Löwenstein empfiehlt einen Nährboden aus Eimasse und synthetischer Lösung, der Asparagin hinzugefügt war, während Milch und Pepton weggelassen wurden. Als Farbstoffzusatz schlägt er Malachitgrün 1:3500 oder Kongorot vor.

Hohn modifizierte 1926 den Nährboden nach Lubenau und nannte diese Modifikation „Substrat 1“. 1929 setzte er seinem „Substrat 1“ Hämatin und Malachitgrün hinzu und konnte dadurch ein besseres Wachstum der Tuberkelbakterien erzielen. „Substrat 3“ ist ein Amino-Einährboden, bei dem die natursaurer Bouillon des „Substrat 1“ durch Lockemann-Lösung ersetzt wurde. 1940 schuf Hohn sein „Substrat 4“, das aus „Substrat 1“, einer Kartoffelemulsion und der eisenhaltigen Lockemann-Lösung besteht.

Witte modifiziert den Petragani-Nährboden, indem er die Hälfte der Milch des Originalnährbodens mit Fleischwasser ersetzt und statt Kartoffelmehl Bohnenmehl empfiehlt. Er weist auch darauf hin, daß der bovine Typ in der Erstkultur durch Zusatz von Glyzerin gehemmt wird und schlägt bei Anlegung von Kulturen Nährböden mit und ohne Zusatz von Glyzerin vor. Er stellt fest, daß bei geschlossenen Röhrchen durch die verminderte Sauerstoffspannung bessere Lebensbedingungen geschaffen werden.

Lichtenstein untersuchte die Brauchbarkeit der Nährböden nach Dorset, Lubenau, Petragani und Hohn und kommt zu dem Ergebnis, daß der Petraganinährboden den anderen an Leistungsfähigkeit überlegen ist.

Steinbrecher untersuchte vergleichend das Sauton-Eigelb-Substrat nach Gottsacker und den Petragani-Eiernährboden modifiziert nach Witte und fand, daß das Sauton-Eigelb-Substrat in folgenden Punkten dem Petraganinährboden überlegen ist:

- a) mehr positive Fälle bei gleichem Ausgangsmaterial
- b) größere Anzahl von Tuberkelbakterienkolonien auf den einzelnen Kulturröhrchen.
- c) einfachere Herstellungsweise.

b) Die Entwicklung der Vorbehandlung

Eine große Schwierigkeit hinsichtlich der Reinzüchtung der Tuberkelbakterien bestand darin, daß das infektiöse Material außer Tuberkelbakterien noch andere Keime enthält, die ein viel schnelleres Wachs-

tum zeigen, die Kulturröhrchen überwuchern und so die angesetzte Kultur mehr oder weniger unbrauchbar machen. Die Ausschaltung der störenden Begleitbakterien wurde im Laufe der Zeit verschieden vorgenommen und immer weiter verbessert. Das Ziel muß dabei sein, diese abzutöten und die Tuberkelbakterien zu schonen, so daß sie in ihrer Wachstumsfreudigkeit und Lebensfähigkeit nicht beeinträchtigt werden.

Robert Koch läßt der Reinkultur die Tierpassage vorausgehen und entnimmt steril Material aus der Milz des Meerschweinchens, um dieses auf erstarrtes Rinderserum zu verimpfen.

Spengler verwendet 1903 zur Abtötung der Begleitbakterien Formalindämpfe, während Piatowski 1904 verdünnte Formalinlösungen dazu benützt.

Uhlenhuth und Xylander gebrauchen das Antiformin — eine Mischung von Natriumhypochlorit-Lösung und Natronlauge — zur Ausschaltung der Begleitbakterien. Die Antiforminbehandlung brachte einen großen Fortschritt, da Antiformin die Begleitbakterien auflöst und das Substrat homogenisiert, während die Tuberkelbakterien durch ihre wachsartige Hülle geschützt sind.

Löwenstein weist auf die hohe Widerstandskraft der Tuberkelbakterien bei der Behandlung mit Säuren (40%ige Schwefelsäure) und Alkalien (35%ige Natronlauge) hin. Sein Schüler Sumiyoshi behandelt das zu untersuchende Material mit 15%iger Schwefelsäure 30 Minuten lang und wäscht nach dem Zentrifugieren den Bodensatz vor Anlegen der Kultur zweimal mit steriler 0,85%iger Kochsalzlösung aus. Zur Isolierung ist dieses Verfahren brauchbar, jedoch zu umständlich.

Hohn vereinfacht diese Methode, indem er 1 bis 2 ccm des pathologischen Materials mit 10 bis 12%iger Schwefelsäure behandelt. Er läßt die Schwefelsäure 20 bis 30 Minuten einwirken und nimmt für 1 bis 2 ccm Sputum 10 ccm Schwefelsäure. Auch verzichtet er auf das Auswaschen des Sediments und beimpft die Eiernährböden direkt mit dem sauren Bodensatz. Dabei ging er von der Erwägung aus, daß der Säurerest das Wachstum der Tuberkelbakterien günstig beeinflussen könnte, da Sander schon 1893 darauf hinwies, daß die Tuberkelbakterien einen sauren Nährboden lieben. Hohn betrachtet das Problem der Begleitbakterienabtötung mit der Verwendung von 10%iger Schwefelsäure bei 20 Minuten langer Einwirkung und anschließender Verimpfung des ungewaschenen Sediments auf Eiernährböden als gelöst.

Hermann hält die Vorbehandlung des Materials mit Antiformin der Schwefelsäurebehandlung überlegen, weil hierdurch eine Anreicherung der Tuberkelbakterien erfolge.

Hohn und Lichtenstein können diesen Vorteil jedoch nicht bestätigen und halten die Methode nach Löwenstein-Sumiyoshi und deren Modifikation nach Hohn dem Antiforminverfahren gegenüber

überlegen. Vergleichende Untersuchungen von Orsechowski ergeben im Verhältnis zur Hohnschen Säure und Uhlenhuthschen Antiforminbehandlung 96 : 39% positive Ergebnisse.

Schrader bestätigt ebenfalls die guten Ergebnisse des Schwefelsäureverfahrens. Er läßt jedoch die Schwefelsäure 30 Minuten lang einwirken.

Suranyi und Putnoky verwenden neben der Schwefelsäure die 25%ige Salzsäure und variieren die Einwirkungszeit von 10 bis 40 Minuten. Sie geben der 25%igen Salzsäure den Vorzug. Mit der Schwefelsäure haben sie in 76,9%, mit der Salzsäure in 95,6% der Fälle Wachstum erzielt. Als günstigste Einwirkungszeit schlagen sie 15 Minuten vor und können so innerhalb von 10—12 Tagen bis zu 4 Wochen auf den Eiernährböden Wachstum verzeichnen.

Seelemann und Klingmüller arbeiteten mit Verdünnungen der 94—98%igen Schwefelsäure und der 25%igen Salzsäure. Sie verwendeten Konzentrationen von 5, 8, 10, 12 und 15% und ließen diese 30 Minuten einwirken. Die 5 und 8%ige Verdünnung ist zur Abtötung der Begleitbakterien aus Organen nicht geeignet, während die 15%ige meist bereits abschwächend oder sogar abtötend auf die Tuberkelbakterien wirkt. Im ganzen gesehen zeigt die Schwefelsäure eine bessere Abtötung der Begleitbakterien, dagegen wachsen bei der Salzsäurebehandlung die Kolonien früher und üppiger. Auch Brechmann arbeitete schon mit 10%igen Verdünnungen.

Karsten verwendet die 10%ige Schwefelsäure, die er unter mehrfachem Schütteln 20 Minuten und weitere 5 Minuten beim Zentrifugieren bei 3000 Touren ohne überzeugenden Erfolg einwirken läßt. Trotzdem empfiehlt er zur Reinzüchtung von Tuberkelbakterien die Verwendung von Schwefelsäure.

Wolters und Dehmel bezeichnen die 10%ige Salzsäure für nicht ausreichend zur Abtötung der Begleitbakterien. Sie hatten bei Sputum humanen Ursprungs in 10%, bei Sputum von Rindern in 73% der Fälle Verunreinigungen. Sie empfehlen die 15%ige Salzsäure mit anschließender Verimpfung des Untersuchungsmaterials auf Petragnaninährböden und in Malachitgrün-Besredka-Bouillon. Für die Milch geben sie folgendes Verfahren an:

15 ccm Milch werden in spitzen Zentrifugenröhrchen 15 Minuten bei 2000 Touren zentrifugiert. Rahm und Magermilch werden abgossen, und der Bodensatz wird gelockert. Auf ihn wirken dann 10 ccm einer 3,75%igen Salzsäure 10—15 Minuten unter wiederholtem Durchschütteln und noch weitere 15 Minuten bei neuerlichem Zentrifugieren ein. Die Salzsäure wird abgossen und das Zentrifugenröhrchen umgekehrt auf Fließpapier gestellt. Der Bodensatz wird unter sterilen Bedingungen auf Petragnaninährböden gebracht, wobei für die Erst-

kultur boviner Stämme der Verzicht auf den sonst empfehlenswerten Glycerinzusatz angeraten wird.

Dehmel verglich die 15%ige Salzsäure mit der 10%igen Schwefelsäure und kam zu dem Ergebnis, daß die Schwefelsäure die Tuberkelbakterien mehr schädigt als die Salzsäure. Er konnte in 50% der Kulturen bei Behandlung mit Salzsäure ein früheres Wachstum erzielen. Auch Steinbrecher weist auf das günstigere Wachstum und die besseren Ergebnisse bei der Vorbehandlung des Materials mit 3,75%iger Salzsäure im Vergleich zur 10%igen Schwefelsäure hin.

Nach Mouriz soll die Schwefelsäure auf niedrigere Konzentrationen gebracht werden, um die Tuberkelbakterien zu schonen. Sie darf aus praktischen Gründen jedoch nicht unter 4 bis 5% liegen.

Mitscherlich, Reuß und Gürtürk untersuchten vergleichend Sputumproben bei der Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure und Sputusol, — ein dem Antiformin ähnliches Präparat, — welches Kalziumhypochlorid enthält, das durch Alkalihydroxyd gepuffert ist. Sie stellen fest, daß die Vorbehandlung mit Sputusol der Schwefelsäurebehandlung leicht überlegen ist.

Die vergleichende Untersuchung von Sputumproben nach Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure und nach der Methode von Darzin ergab eine weite Überlegenheit des Darzin-Verfahrens. Vergleichende Untersuchungen von Sputumproben nach Vorbehandlung mit 6%iger Schwefelsäure und nach Darzin ergaben die Gleichwertigkeit beider Verfahren. Die gleichen Autoren untersuchten auch 98 tuberkulöse Lymphknoten von Meerschweinchen nach Vorbehandlung mit 6 bis 8%iger Schwefelsäure und nach der Methode Darzin. Sie fanden hierbei, daß die Behandlung mit 6 bis 8%iger Schwefelsäure der Methode Darzin vorzuziehen ist. Nach der Schwefelsäurebehandlung war 76 mal, nach der Vorbehandlung nach Darzin nur 62 mal Wachstum erzielt worden. Hinsichtlich des ersten Auftretens von Kolonien konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Verfahren gesehen werden. Verunreinigungen traten allerdings nach dem Darzin-Verfahren häufiger auf.

Breul und Hedderich haben in jüngster Zeit kombinierte Wärme-Säure-Verfahren ausgearbeitet, bei welchen die Wachstumsfreudigkeit der Tuberkelbakterien durch die schonende Behandlung erhöht wird. Sie verwenden dabei niedrige Salzsäure- und Schwefelsäurekonzentrationen und gleichen deren geringere Wirkung durch eine vorausgegangene Erwärmung des Untersuchungsmaterials aus. Um das Wachstum der Begleitbakterien zu verhindern, bedarf es hier aber der Zusammenwirkung von Vorbehandlung sowie einer hemmenden Komponente des Nährsubstrates, wie dies zum Beispiel der Malachitgrünzusatz des Petragraninährbodens darstellt. Breul fand das Wachstumsoptimum für Tuberkelbakterien bei folgender Vorbehandlung:

Erwärmung der Milch auf 50° C während der Dauer von 5 Minuten, anschließend Zentrifugieren und Vorbehandlung des Bodensatzes mit 1,5%iger Salzsäure. Hedderich gibt als beste Vorbehandlung folgendes Verfahren an:

Erwärmung der Milch auf 55° C, die Einwirkungsdauer dieser Temperatur beträgt 5 Minuten. Anschließend Zentrifugieren sowie Behandlung des Bodensatzes mit 2%iger Schwefelsäure. Beide Verfahren erwiesen sich gegenüber der alleinigen Vorbehandlung mit 3,75%iger Salzsäure bzw. mit 10%iger Schwefelsäure überlegen.

C. Eigene Untersuchungen

1) Auftrag

Hedderich und Breul stellen fest, daß mit den von ihnen ausgearbeiteten Züchtungsverfahren Tuberkelbakterienkolonien schon nach 5 Tagen sichtbar waren. Um die Ergebnisse der genannten Autoren zu erhärten und die Brauchbarkeit namentlich der von Hedderich beschriebenen Methode bei der Kultur von Tuberkelbakterien aus pathologischem Material zu überprüfen, hat mir Herr Professor Dr. H. Keller den Auftrag erteilt, vergleichende Untersuchungen zwischen der bisher gehandhabten Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure und der von Hedderich empfohlenen bei Verwendung von Petagnaninährböden mod. nach Witte mit und ohne Zusatz von Glycerin anzustellen.

2) Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial wurden am städtischen Schlachthof Gießen tuberkulöse Lymphknoten und Organteile von Schweinen und Rindern entnommen. Außerdem habe ich Organe von Meerschweinchen, die im Rahmen der diagnostischen Arbeit des Institutes beimpft wurden und bei der Sektion Tuberkulose zeigten, bei meinen Untersuchungen verwendet. Ferner verarbeitete ich 2 Milchproben, bei deren mikroskopischen Untersuchung alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen worden waren.

3) Mikroskopische Untersuchung

Das verwendete Material wurde mikroskopisch auf das Vorhandensein von alkohol- und säurefesten Stäbchen mittels Ziehl-Neelsen-Färbung und der von Buss angegebenen Modifikation untersucht. In der nachstehenden Tabelle I werden die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung zusammengefaßt und mit dem erzielten Wachstum verglichen.

Aus der Tabelle I ist folgendes zu ersehen:

Es wurden 45 Fälle untersucht, die aufgrund des pathologisch-anatomischen Befundes als Tuberkulose diagnostiziert wurden.

In 28 Fällen konnten mittels der Färbung nach Ziehl-Neelsen, in 31 Fällen mittels der Modifikation nach Buss alkohol- und säurefeste Stäbchen festgestellt werden. In einem Fall wurde der mikroskopische Nachweis von alkohol- und säurefesten Stäbchen durch die Ziehl-Neelsen-Färbung erbracht, während die Modifikation nach Buss versagte. In 4 Fällen erwies sich dagegen die Modifikation nach Buss der Ziehl-Neelsen-Färbung überlegen.

In 40 Fällen wurde durch den Kulturversuch das Wachstum von Kolonien erzielt, die sich bei der mikroskopischen Untersuchung als alkohol- und säurefeste Stäbchen erwiesen. 10 mal wurden aus dem verwendeten Material alkohol- und säurefeste Stäbchen gezüchtet, während die bakterioskopische Untersuchung zu keinem Ergebnis führte. In 2 Fällen verlief die kulturelle Untersuchung negativ, trotzdem die mikroskopische Untersuchung mit Hilfe beider Färbemethoden alkohol- und säurefeste Stäbchen erkennen ließ.

In 3 Fällen wurden weder mikroskopisch noch kulturell alkohol- und säurefeste Stäbchen bzw. deren Kolonien festgestellt.

Tabelle I

Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse der Färbungen nach Ziehl-Neelsen und nach Buss sowie der Kultur.

Fall Nr.	Verwendetes Material	Färbung n. Ziehl-Neelsen	Mod. n. Buss	Koloniewachstum
1.	Lungenlymphknoten v. Rind schwach verkäst	+	+	+
2.	Darmlymphknoten v. Rind schwach verkalkt	—	—	+
3.	Lungenlymphknoten v. Rind frisch verkäst	+	+	+
4.	Darmlymphknoten v. Schwein verkalkt	—	—	—
5.	Magenlymphknoten v. Schwein verkäst	+	+	+
6.	Lungenlymphknoten v. Schwein frisch verkäst	—	—	+
7.	Lunge v. Rind verkäste Herde	—	+	+
8.	Darmlymphknoten v. Schwein frisch verkäst	+	—	+
9.	Darmlymphknoten v. Schwein schwach verkäst	+	+	+
10.	Darmlymphknoten v. Schwein schwach verkäst	—	—	+
11.	Halslymphknoten v. Schwein frisch verkäst	+	+	+
12.	Leberlymphknoten v. Kalb schwach verkäst	+	+	—
13.	Blinddarmlymphknoten v. Schwein schwach verkäst	+	+	+

Fortsetzung der Tabelle I:

Fall Nr.	Verwendetes Material	Färbung n. Ziehl-Neelsen	Mod. n. Buss	Kolonie- wachstum
14.	Darmlymphknoten v. Schwein schwach verkäst	—	—	+
15.	Darmlymphknoten v. Schwein verkäst	—	—	+
16.	Leber v. Rind verkäster Herd	+	+	+
17.	Leber v. Rind verkäster Herd	+	+	+
18.	Mittelfellymphknoten v. Rind schwach verkäst	+	+	+
19.	Lunge v. Schwein verkäster Herd	+	+	+
20.	Magenlymphknoten v. Schwein schwach verkäst	—	—	+
21.	Leberlymphknoten v. Schwein verkäst	+	+	+
22.	Darmlymphknoten v. Schwein verkäst und verkalkt	+	+	+
23.	Darmlymphknoten v. Schwein schwach verkalkt	—	—	—
24.	Euter v. Rind strahlige Verkäsung	+	+	—
25.	Euterlymphknoten v. Rind verkäst	+	+	+
26.	Lunge v. Rind verkäster Herd	+	+	+
27.	Lungenlymphknoten v. Rind verkäst und verkalkt	—	—	+
28.	Darmlymphknoten v. Rind stark verkäst	+	+	+
29.	Leber v. Meerschweinchen miliare Herde	—	—	+
30.	Milz v. Meerschweinchen miliare Herde	—	+	+
31.	Leber v. Meerschweinchen miliare Herde	—	—	+
32.	Milz v. Meerschweinchen miliare Herde	+	+	+
33.	Darmlymphknoten v. Schwein frisch verkäst	+	+	+

Fortsetzung der Tabelle I:

Fall Nr.	Verwendetes Material	Färbung n. Ziehl-Neelsen	Mod. n. Buss	Kolonie- wachstum
34.	Darmlymphknoten v. Schwein schwach verkäst	+	+	+
35.	Milch v. Rind	+	+	+
36.	Milch v. Rind	+	+	+
37.	Darmlymphknoten v. Schwein frisch verkäst	+	+	+
38.	Darmlymphknoten v. Schwein verkäst	+	+	+
39.	Milz v. Rind miliare Herde	—	+	+
40.	Milz v. Rind miliare Herde	—	—	—
41.	Leber v. Rind verkäster Herd	+	+	+
42.	Leberlymphknoten v. Kalb schwach verkäst	—	+	+
43.	Leberlymphknoten v. Kalb schwach verkäst	+	+	+
44.	Leber v. Kalb verkäster Herd	+	+	+
45.	Leber v. Kalb verkäster Herd	—	—	+

Zusammenfassung der Tabelle I:

	Färbung nach Ziehl-Neelsen	Modifik. n. Buss	Kolonie- wachstum
positiv	28 = 62,2%	31 = 68,9%	40 = 88,8%
negativ	17 = 37,8%	14 = 31,1%	5 = 11,2%

4) Kulturverfahren

Der Kulturversuch wurde wie folgt durchgeführt:

Das verwendete Material wurde zunächst mit steriler Schere und Pinzette in möglichst kleine Teile zerschnitten und im Mörser unter Hinzufügung von steriler physiologischer Kochsalzlösung fein verrieben. Darauf wurde die so gewonnene Verreibung durch sterile Gaze in ein steriles Röhrchen filtriert. Um für beide Versuchsanordnungen das

gleiche Ausgangsmaterial zu haben, wurde das Filtrat in 2 gleiche Teile geteilt und getrennten Vorbehandlungen unterzogen.

a) Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure

Das Filtrat wurde 20 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit dann abgegossen und dem Bodensatz ca. die achtfache Menge 10%iger Schwefelsäure hinzugefügt. Um eine gleichmäßige Suspension zu erreichen, wurde der Bodensatz mit einer ausgeglühten Öse aufgelockert und mit der Schwefelsäure verrührt. Nach der Einwirkungszeit von 10 Minuten wurde mit einer Tourenzahl von 2000 10 Minuten lang zentrifugiert, die überstehende Säure alsdann abgegossen und der ungewaschene, saure Bodensatz auf Petragnaninährböden mod. nach Witte mit und ohne Glycerinzusatz ausgestrichen. Anschließend kamen die Röhrchen nach vorausgegangener Abdichtung mit Paraffin für 7 Wochen in den Brutschrank.

b) Methode nach Hedderich

Das Filtrat wurde zunächst für 5 Minuten in ein doppeltes Wasserbad von 55° C getan. Hierauf wurde es 20 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit dann abgegossen und dem Bodensatz ca. die achtfache Menge 2%iger Schwefelsäure hinzugefügt. Um eine gleichmäßige Suspension zu erreichen, wurde der Bodensatz mit einer ausgeglühten Öse aufgelockert und mit der Schwefelsäure verrührt. Nach der Einwirkungszeit von 10 Minuten wurde mit einer Tourenzahl von 2000 10 Minuten lang zentrifugiert, die überstehende Säure alsdann abgegossen und der ungewaschene saure Bodensatz auf Petragnaninährböden mod. nach Witte mit und ohne Zusatz von Glycerin verimpft. Anschließend kamen die Röhrchen nach vorheriger Abdichtung mit Paraffin für 7 Wochen in den Brutschrank.

Die Kontrolle der beimpften Röhrchen erfolgte zur Feststellung des ersten Wachstums 14 Tage lang täglich, danach jeden 2. Tag. Erstes Wachstum und Verunreinigung wurde protokollarisch erfaßt, sie sind in der Tabelle II festgehalten. Die Röhrchen, bei denen Verunreinigungen auftraten, schloß ich von weiteren Versuchen aus, nur die gewachsenen Kolonien wurden mikroskopisch untersucht. Die Untersuchung der Verunreinigungen ergab Kokken und Pilze. Kokken wurden vor allem in den Röhrchen festgestellt, bei denen das verimpfte Material von regionalen Lymphknoten des Magen-Darmkanals stammte.

Aus der Tabelle II ist nachstehendes ersichtlich:

Das früheste Sichtbarwerden der Kolonien nach der Methode Hedderich erfolgte ohne Zusatz von Glycerin am 6. und mit Glycerin-

Tabelle II:
Erstes Wachstum der Kolonien nach Tagen bei Vorbehandlung

Fall Nr.	Untersuchungsmaterial	mit 10%iger Schwefelsäure ohne Glycerin		nach der Methode Hedderich ohne Glycerin		mit Glycerin		mit Glycerin	
		23	17	17	17	23	15	11	11
1.	Lungenlymphknoten v. Rind	23	23	17	17	K	17	23	15
2.	Darmlymphknoten Rind	21	21	16	16	0	0	0	0
3.	Lungenlymphknoten v. Rind	K	K	K	19	13	19	19	13
4.	Darmlymphknoten v. Schwein	K	K	K	K	K	K	K	K
5.	Magenlymphknoten v. Schwein	K	0	K	K	19	10	13	10
6.	Lungenlymphknoten v. Schwein	K	31	K	K	19	31	12	12
7.	Lunge v. Rind	K	23	19	19	19	K	0	K
8.	Darmlymphknoten v. Schwein	K	K	16	16	K	K	K	K
9.	Darmlymphknoten v. Schwein	23	K	16	16	19	K	K	K
10.	Darmlymphknoten v. Schwein	K	K	K	K	K	K	K	K
11.	Halslymphknoten v. Schwein	22	K	12	18	K	K	18	K
12.	Leberlymphknoten v. Kalb	K	K	K	K	K	K	K	K
13.	Blinddarmlymphknoten v. Schwein	K	25	18	K	0	18	22	K
14.	Darmlymphknoten v. Schwein	K	22	0	K	K	K	K	K
15.	Darmlymphknoten v. Schwein	12	12	12	12	9	K	K	0
16.	Darmlymphknoten v. Schwein	12	12	9	12	6	6	12	7
17.	Leber v. Rind	12	12	12	12	9	6	12	7
18.	Leber v. Rind	12	12	12	12	9	6	6	6
19.	Mittelfellymphknoten v. Rind	12	12	12	12	7	7	7	7
20.	Lunge v. Schwein	14	K	K	9	K	K	K	6
21.	Magenlymphknoten v. Schwein	14	46	11	11	7	23	7	0
22.	Leberlymphknoten v. Schwein	14	K	K	K	9	K	14	6
23.	Darmlymphknoten v. Schwein	K	33	11	11	7	28	K	6
		K	0	K	0	0	0	0	0

24.	Euter v. Rind	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
25.	Euterlymphknoten v. Rind	28	K	23	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
26.	Lunge v. Rind	24	34	34	K	24	24	24	24	24	24	24	24	24
27.	Lungenlymphknoten v. Rind	24	K	34	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
28.	Darmlymphknoten v. Rind	K	22	26	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
29.	Leber v. Meerschweinchen	0	29		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
30.	Milz v. Meerschweinchen	K	K		16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
31.	Leber v. Meerschweinchen	K	K		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
32.	Milz v. Meerschweinchen	21	K		11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
33.	Darmlymphknoten v. Schwein	0	16	16	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
34.	Darmlymphknoten v. Schwein	38	16	16	12	10	12	10	12	10	10	10	10	10
35.	Milch v. Rind	30	30	20	16	10	10	10	10	10	10	10	10	10
36.	Milch v. Rind	16	16	16	13	13	13	13	10	10	10	10	10	10
37.	Darmlymphknoten v. Schwein	44	44		33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
38.	Darmlymphknoten v. Schwein	46	K		33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
39.	Milz v. Rind	23	27		19	19	19	19	16	16	16	16	16	16
40.	Milz v. Rind	K	K		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
41.	Leber v. Rind	K	K		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
42.	Leberlymphknoten v. Kalb	14	14		14	14	14	14	10	10	10	10	10	10
43.	Leberlymphknoten v. Kalb	14	0		14	11	11	11	9	11	11	11	11	11
44.	Leber v. Kalb	22	18		18	18	18	18	14	14	14	14	14	14
45.	Leber v. Kalb	K	K		K	K	K	K	16	16	16	16	16	16

Zeichenerklärung: K = kein Wachstum
 0 = Verunreinigungen

zusatz am 5. Tag. Nach der alten Methode waren die ersten Kolonien ohne Zusatz von Glycerin am 11. und bei Zusatz von Glycerin am 9. Tage sichtbar.

Das durchschnittlich früheste Auftreten von Kolonien lag bei der Methode Hedderich ohne Zusatz von Glycerin am 14,5. und bei Zusatz am 11,5. Tag. Daraus ergibt sich für das früheste Wachstum ein Gesamtdurchschnitt für die Methode Hedderich von 13 Tagen. Bei Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure lag das durchschnittlich früheste Sichtbarwerden von Kolonien ohne Zusatz von Glycerin am 23. und bei Glycerinzusatz am 17. Tag. Daraus ergibt sich für das früheste Wachstum ein Gesamtdurchschnitt für die alte Methode von 20 Tagen.

Nach beiden Methoden konnten von den 45 angesetzten Versuchen insgesamt 40 mal Kolonien herausgezüchtet werden, die in Form und Aussehen Tuberkelbakterienkolonien glichen. (= 88,8%) In 39 Fällen sind nach der Methode Hedderich diese Kolonien gewachsen (= 87%), bei der alten Methode waren es 35 Fälle (= 78%). In 5 Fällen konnten nur nach der Methode Hedderich Kolonien gezüchtet werden, während die alte Methode versagte. In einem Falle gelang die Kultur nach der alten Methode, während die Züchtung nach der Methode Hedderich mißlang. (In diesem Falle mußten die Röhrchen wegen Verunreinigung vom Versuch ausgeschlossen werden.)

Von den insgesamt angesetzten Röhrchen waren nach der Methode Hedderich 25 Röhrchen verunreinigt (= 8,7%). Bei der alten Methode mußten wegen Verunreinigung von den insgesamt angesetzten Röhrchen 7 ausgeschieden werden (= 3,3%).

Nach Ausscheiden der verunreinigten Röhrchen sind nach der Methode Hedderich 187 Röhrchen mit Kolonien bewachsen gewesen (= 72,8%). Nach der alten Methode waren nach Ausscheiden der verunreinigten Röhrchen 127 Röhrchen mit Kolonien bewachsen (= 62%).

Nach Ablauf von 7 Wochen wurden die angegangenen Kolonien gezählt und die Wachstumsstärke in Tabelle III zusammengefaßt. Der Umfang der Kolonien, der aus der Tabelle nicht ersichtlich ist und der insbesondere bei jenen Röhrchen, die ein mäßiges bis schwaches Wachstum zeigten, beachtet wurde, war nach der kombinierten Vorbehandlung mit Wärme und 2%iger Schwefelsäure bedeutend größer, als bei den Röhrchen, die mit 10%iger Schwefelsäure behandelt worden waren. Bei starkem Wachstum und bei Rasenbildung war ein Unterschied in der Größe der Kolonien nicht festzustellen.

Aus der Tabelle III ist folgendes ersichtlich:

1) Nach der Methode Hedderich zeigten

11% der Röhrchen Wachstum mit	1	Kolonie
17% der Röhrchen Wachstum mit	2—5	Kolonien
29% der Röhrchen Wachstum mit	6—10	Kolonien

Tabelle III:
Wachstumsstärke bei Vorbehandlung

Fall Nr.	mit 10%iger Schwefelsäure					nach der Methode Hedderich					
	ohne Glyzerin		mit Glyzerin			ohne Glyzerin			mit Glyzerin		
1.	++++	+++	++++	++++		—	++++	+++++	++++	++++	+++++
2.	+++	+++	+++	+		0	0	0	0	0	0
3.	—	—	—	+++		++++	+++	+++	+++	—	—
4.	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—
5.	—	0	—	—		+	+++	+++	++++	+++++	—
6.	—	+++++	—	—		+++	++++	+++	++	++	++
7.	—	+++	++	++		++	—	0	—	+++	++++
8.	—	—	+++	++		—	—	—	—	++	+++
9.	+++++	—	+++	+++		—	+++	—	—	+++++	+++++
10.	—	—	—	—		—	—	—	—	+++	++
11.	+	—	++	++		—	—	+	—	0	+++
12.	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—
13.	—	++	+++	—		0	+	+++	—	—	+++
14.	—	+++	0	—		—	—	—	—	0	—
15.	++++	++++	++++	++++		+++	—	++++	++++	+++++	++++
16.	++++	++++	++++	++++		++++	++++	++++	++++	+++++	+++++
17.	++++	+++	++++	+++		++++	+++++	+++	+++	++++	++++
18.	+++	++	+++	++++		+++	+++	+++	++++	++++	+++
19.	++	—	++	—		—	—	—	—	++	—
20.	+++	+	++	++++	++	+++	+++	++	0	++++	++++
21.	++	—	—	—	—	+++	—	++	++	—	+
22.	—	++	++	+++	++	++	+	—	++	+++	+++
23.	—	0	—	0	—	0	0	—	0	—	0
24.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25.	+++	—	+++	+++	++	0	++++	++++	++++	+++	—
26.	+++++	++	+++	—	++	—	+++	+++	++	++++	++++
27.	++	—	+	++	+++	—	—	—	0	+++	+++
28.	—	++	++	++	+++	0	++	++	++++	+++	+++
29.	0	++	—	—	—	0	—	—	—	++	++
30.	—	—	++	—	+++	+++	—	—	++	+++	+++
31.	—	—	—	—	—	+	0	—	+	+	+
32.	++	—	++	+++	++	—	++	—	+++	+++	+++
33.	0	+++	+++	++++	+++	+++++	+++++	+++++	+	0	++
34.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++++	+++++
35.	+	+++	+	+	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
36.	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
37.	+	++	++	—	—	+	—	—	+	++	—
38.	+	—	+	++	—	++	0	—	++	+	—
39.	+++	+++	+++	+++	—	++	+++	—	+++	+++	—
40.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
41.	—	—	—	—	—	0	—	—	—	+++	—
42.	+++	+++	++	+	—	+++	+	—	++++	++	—
43.	++	0	+	++	—	++	++	—	++	+++	—
44.	++	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—
45.	—	—	—	—	—	++	++	—	+	+	—

Zeichenerklärung: — = Kein Wachstum +++++ = 11–20 Kolonien
 + = 1 Kolonie ++++++ = über 20 Kolonien und Rasenbildung
 ++ = 2–5 Kolonien 0 = Verunreinigung
 +++ = 6–10 Kolonien

29% der Röhrrchen Wachstum mit 11—20 Kolonien

14% der Röhrrchen Wachstum mit üb. 20 Kolonien und Rasenbildung

2) Nach der alten Methode zeigten

13% der Röhrrchen Wachstum mit 1 Kolonie

33% der Röhrrchen Wachstum mit 2—5 Kolonien

33% der Röhrrchen Wachstum mit 6—10 Kolonien

17% der Röhrrchen Wachstum mit 11—20 Kolonien

4% der Röhrrchen Wachstum mit üb. 20 Kolonien und Rasenbildung

5) Überprüfung der gewachsenen Kolonien

a) mikroskopisch

Die mikroskopische Untersuchung der gewachsenen Kolonien ergab in allen Fällen alkohol- und säurefeste Stäbchen, die gleichmäßig groß und schlank waren.

b) kulturell

Um festzustellen, ob es sich um pathogene oder apathogene Mykobakterien handelt, wurde eine Überprüfung des erzielten Wachstums durch Überimpfen auf Agarnährböden vorgenommen. Nach Bergey's Manual gehen apathogene Mykobakterien auf Agar an, während Tuberkelbakterien kein Wachstum zeigen. Auf diese Differenzierungsmethode wird auch von Meyn besonders hingewiesen. Die gewachsenen Kolonien gingen nur in einem Falle auf Agar an. (Fall Nr. 34) Hier lag also keine Tuberkulose vor. In sämtlichen anderen Fällen verliefen diese Untersuchungen negativ, so daß auf ein Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* geschlossen werden konnte.

c) durch den Tierversuch

Die Überprüfung der gewachsenen Kolonien erfolgte weiterhin auch durch den Tierversuch. Um diesen möglichst einzuschränken, wurden von den gezüchteten Stämmen nur 19, die ein besonders frühes Wachstum zeigten, dieser Kontrolle unterzogen. Dabei wurde auf die Beimpfung eines zweiten Kontrolltieres verzichtet. Die Beimpfung der Meerschweinchen erfolgte in der nachstehend dargestellten Form:

Eine Kolonie wurde in steriler physiologischer Kochsalzlösung mit der Öse verrieben. Von dieser Suspension wurde 1 ccm in die Nähe des rechten Kniefaltenlymphknotens verimpft. Die Kontrolle der Kniefaltenlymphknoten erfolgte vom 10. Tage an. Nach 6 Wochen wurden die Meerschweinchen getötet, sofern sie nicht vorher eines natürlichen Todes starben. Die Ergebnisse dieser Kontroll-Tierversuche sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV:

Fall Nr.	Kultur- versuch am:	Verimpft. Röhrchen	Tag der Beimpfg. d. Meerschw.	Pathologisch-anatomischer Befund
5	15. 12. 51	H.m.G.R 3	29. 5. 52	Kniefaltenlymphknoten auf das Doppelte vergrößert. Im Ausstrich alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen.
7	4. 1. 52	H.m.G.R 1	29. 5. 52	Meerschweinchen am 23. 6. 52 gestorben. Kniefaltenlymphknoten wenig geschwollen. Alkohol- und säurefeste Stäbchen im Ausstrich nachgewiesen.
9	4. 1. 52	H.m.G.R 3	29. 5. 52	Meerschweinchen am 9. 6. 52 gestorben. Kniefaltenlymphknoten auf das Doppelte vergrößert. Einzelne säurefeste Granula in Phagozytose und Stäbchenfragmente im Ausstrich gefunden.
11	7. 1. 52	H.m.G.R 4	29. 5. 52	negativ.
16	11. 1. 52	H.o.G. R 4	26. 6. 52	Kniefaltenlymphknoten schwach vergrößert. Mikroskopische Untersuchungen negativ.
17	11. 1. 52	H.m.G.R 4	26. 6. 52	Meerschweinchen am 1. 8. 52 an akuter Miliartuberkulose gestorben.
18	18. 1. 52	H.m.G.R 1	26. 6. 52	Kniefaltenlymphknoten verkäst. Mikroskopische Untersuchung ergab alkohol- und säurefeste Stäbchen.
20	18. 1. 52	H.m.G.R 3	26. 6. 52	negativ.
22	25. 1. 52	H.m.G.R 2	26. 6. 52	Kniefaltenlymphknoten schwach vergrößert. Mikroskopische Untersuchung negativ.
28	3. 5. 52	H.m.G.R 2	9. 7. 52	Lymphknoten verkäst. Miliare Herde in der Milz und Leber.
29	3. 5. 52	H.m.G.R 3	9. 7. 52	Kniefaltenlymphknoten verkäst. Im Ausstrich alkohol- und säurefeste Stäbchen gefunden.

Fortsetzung der Tabelle IV:

Fall Nr.	Kultur- versuch am:	Verimpft. Röhrchen	Tag der Beimpfg. d. Meerschw.	Pathologisch-anatomischer Befund
30	9. 5. 52	H.m.G.R 2	9. 7. 52	Meerschweinchen am 15. 8. 52 gestorben. Lymphknoten stark vergrößert. Einzelne Herde in Milz und Leber.
31	9. 5. 52	H.m.G.R 2	9. 7. 52	Lymphknoten geschwollen. Im Ausstrich alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen.
32	19. 5. 52	a.M.o.G.R 1	9. 7. 52	Kniefaltenlymphknoten verkäst. Im Ausstrich alkohol- und säurefeste Stäbchen gefunden.
33	19. 5. 52	a.M.o.G.R 2	12. 7. 52	Kniefaltenlymphknoten verkäst. Im Ausstrich alkohol- und säurefeste Stäbchen gefunden.
34	29. 5. 52	H.o.G. R 3	12. 7. 52	negativ.
35	12. 6. 52	H.o.G. R 3	12. 7. 52	Meerschweinchen starb am 16. 8. 52 an akuter Miliartuberkulose.
39	24. 6. 52	a.M.m.G.R 2	12. 7. 52	Kniefaltenlymphknoten schwach verkäst. Einzelne alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen.
44	24. 6. 52	H.m.G.R 2	12. 7. 52	Lymphknoten verkäst. In der Milz einzelne stecknadelkopfgroße Herde sichtbar.

Zeichenerklärung:

H. = Methode Hedderich m.G. = mit Glyzerin
a.M. = alte Methode R. = Röhrchen
o.G. = ohne Glyzerin

Aus der Tabelle IV ist folgendes ersichtlich:

Bei 3 Meerschweinchen war der pathologisch-anatomische Befund vollkommen negativ. Bei 2 weiteren Tieren waren die regionären Kniefaltenlymphknoten zwar schwach vergrößert, im Ausstrich konnten jedoch keine Erreger festgestellt werden.

Bei 4 Meerschweinchen waren die rechten Kniefaltenlymphknoten schwach vergrößert, bei 5 Meerschweinchen waren sie verkäst. In den Lymphknotenausstrichen konnten in jedem dieser Fälle alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden.

Bei 3 Meerschweinchen waren die Lymphknoten verkäst und vereinzelte miliare Herde in Milz und Leber sichtbar. Zwei Meerschweinchen starben an akuter Miliartuberkulose.

Der eindeutige Beweis, daß die gewachsenen Kolonien Tuberkelbakterienkolonien waren, konnte somit nur in 5 Fällen erbracht werden. Hier zeigten die Meerschweinchen das pathologisch-anatomische Bild der generalisierten Tuberkulose. Bei weiteren 5 Meerschweinchen lag eine Verkäsung der regionären Lymphknoten vor. Hier kann mit größter Wahrscheinlichkeit auf Tuberkulose geschlossen werden. Nach Bergey's Manual ist zwar die Verkäsung der Lymphknoten bei sonst negativem Befund kein Beweis für das Vorliegen von Tuberkulose, da auch das *Mycobacterium phlei* eine Abszeßbildung verursachen kann. Hätte jedoch das *Mycobacterium phlei* die Abszeßbildung verursacht, dann wäre Wachstum auf Agarnährböden erzielt worden. In 4 Fällen konnten in den regionären Lymphknoten alkohol- und säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden. Auch hier kann Tuberkulose vorliegen, da Buss und Lang diese Möglichkeit durch Versuche erhärteten. Sie hatten aus den Kniefaltenlymphknoten solcher nicht offensichtlich erkrankter Meerschweinchen Kulturen angelegt und Tuberkelbakterienkolonien gezüchtet, die bei weiteren Versuchstieren sichtbare generalisierte Tuberkulose hervorriefen. Bei 5 Meerschweinchen waren keine Anzeichen einer spezifischen Infektion zu sehen. Es sei hier jedoch auf Untersuchungen von Rolle und Mayer verwiesen, die festgestellt haben, daß bei chronischer Tuberkulose die Virulenz der Erreger sehr minimal sein kann. Die Meerschweinchen reagieren vielleicht noch mit einer Tuberkulinallergie, zeigen jedoch bei der Sektion weder spezifische Organveränderungen, noch lassen sich Tuberkelbakterien in den Organen durch den Tierversuch ermitteln. Nach ihnen ist „zum Nachweis der Tuberkulosebakterien im Material chronisch infizierter alter Kühe der Tierversuch nicht geeignet.“

D. Zusammenfassung

Vergleichend wurde das Wachstum von Tuberkelbakterien auf Petrananinährböden, modifiziert nach Witte, bei Vorbehandlung des Materials mit 10%iger Schwefelsäure, bzw. mit 2%iger Schwefelsäure bei vorheriger 5 Minuten langer Erwärmung auf 55° C (Verfahren nach Hedderich) untersucht.

Insgesamt fanden 45 Fälle — Lymphknoten und Organmaterial mit den pathologisch-anatomischen Veränderungen der Tuberkulose-Verarbeitung. Bei der bakterioskopischen Untersuchung konnten mittels Ziehl-Neelsen-Färbung in 28, mittels der Modifikation nach Buss in 31 Fällen alkohol- und säurefeste Stäbchen in Größe und Form der Tuberkelbakterien gesehen werden. Diese Färbungen haben somit eine Treffsicherheit von 62,2 bzw. 68,9%. Hierbei muß festgestellt werden, daß die Modifikation nach Buss klarere Bilder ergibt und die Kontrastfarben (rot-grün) die Tuberkelbakterien leichter auffinden lassen.

Die Züchtung war mit dem kombinierten Wärme-Schwefelsäure-Verfahren nach Hedderich 39 mal (87%), mit dem früheren Säureverfahren bei Verwendung von 10%iger Schwefelsäure aber 35 mal (78%) erfolgreich. Insgesamt gelang der Kulturversuch in 40 = 88,8% der Fälle.

Im einzelnen war die Vorbehandlung mit 2%iger Schwefelsäure bei vorheriger Erhitzung der Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure in folgenden Punkten überlegen:

- 1) Früheres Sichtbarwerden der Kolonien.
- 2) Sicherere Versuchsergebnisse bei gleichem Ausgangsmaterial.
- 3) Erhöhte Wachstumsfreudigkeit.

Dagegen zeigte sich die Vorbehandlung mit 10%iger Schwefelsäure bei der Abtötung der Begleitbakterien dem kombinierten Wärme-Säurebehandlungsverfahren überlegen. In einem Falle gelang die Kultur des Erregers nur mit letzterem Verfahren — die mit dem nach der zu erprobenden neuen Methode vorbehandelten Material beimpften Röhrchen fielen wegen Verunreinigung aus.

Die mit dem neuen Verfahren nach Hedderich erzielten besseren Versuchsergebnisse sind auf die größere Schonung der Tuberkelbakterien bei dieser Methode zurückzuführen. Die Methode kann zur Züchtung dieser Erreger aus nicht zu stark mit Begleitkeimen verunreinigtem Material empfohlen werden.

E. Literaturverzeichnis

- Anzilotti: Zitat nach Gottsacker.
- Bergey: Manual of Determinative Bacteriology 1948.
- Besredka: Ein neuer Nährboden für Tuberkelbazillen. Ztschr. Tbc. 21/53 (1913).
- Breul: Beitrag zur Züchtungsmethodik der Tuberkelbakterien aus Milch unter Anwendung von Salzsäure und Wärme. Inaug. Diss. Gießen 1951.
- Brechmann: Tuberkelbazillennachweis mit besonderer Berücksichtigung der Kulturmethode. Zbl. Bakt. Orig. 101/26/1926.
- Buss: Der mikroskopische Nachweis der Tuberkelbakterien. Der Lebensmitteltierarzt Bd. 2/151/1951.
- Buss und Lang: Rindertuberkulose und Milchhygiene. Der Lebensmitteltierarzt Bd. 1/52/1950.
- Capaldi: Eidotter als Nährzusatz. Zbl. Bakt. I Orig. 20/800/1896.
- Dehmel: Über die Technik der Tuberkelbakterienzüchtung und ihre Fehlerquellen als Ursache verschiedener Untersuchungsergebnisse. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 130/450/1933.
- Dorset: The use of eggs as a medium for the cultivation of Bacillus tuberculosis Americ. Medicine 3/555/1902.
- Gildemeister: Allgemeine, besondere und differential-diagnostische Nährböden einschließlich Trocken- und Konservennährböden. Kolle-Kraus-Uhlenhuth: Handbuch d. path. Mikroorg. 3. Aufl. Jena 1929/IX/929.
- Gottsacker: Entwicklung der Kultur des Tuberkelbazillus seit R. Kochs Zeiten im Jahre 1882 bis heute. Zbl. f. Bakt. Ref. 147/196/1950.
- Hedderich: Züchtung der Tuberkelbakterien aus der Milch mit Hilfe des Schwefelsäure-Behandlungsverfahrens nach Erhitzung der Milch auf 55° C. Inaug. Diss. Gießen 1953.
- Hermann: Zur Frage der Kultur des Tuberkelbazillus und ihre Verwendung zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 102/169/1927.
- Hohn: Die Kultur des Tuberkelbazillus zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 98/460/1926.
- Hohn: Zur Frage der Kultur des Tuberkelbazillus und ihre Verwendung zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 103/342/1927.

- Hohn : 4 Jahre Kultur des Tuberkelbazillus zur Diagnose der Tuberkulose. Zbl. f. Bakt. 113/367/1929.
- Hohn : Der Einährboden zur Kultur des Tuberkelbazillus. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 127/59/1933.
- Hohn : Ein neuer Eiernährboden zur Tuberkelbazillenkultur (Substrat 4) und ein einfacher Verschluß für die Eiröhrchen. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 145/145/1940.
- Huttyra - Marek - Manninger : Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. Gustav Fischer, Jena 1945.
- Karsten : Über den Wert des Säureeinwirkungsverfahrens und der Eiernährböden für die Gewinnung von Reinkulturen von Tuberkelbakterien und für den Nachweis dieser Keime in eingesandten Lungen- und Milchproben. D.T.W. 36/668/1928.
- Koch : Die Ätiologie der Tuberkulose. Berl. klin. Wschr. 15/221/1882.
- Lichtenstein : Zur Frage der Reinzüchtung der Tuberkelbakterien. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 108/239/1928.
- Lockemann : Zur Frage der eiweißfreien Nährlösungen für Tuberkelbazillen. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 142/79/1938.
- Löwenstein : Beitrag zur Leistungsfähigkeit der direkten Züchtung der Tuberkelbakterien aus dem infektiösen Material, mit einem Beitrag zur Geflügeltuberkulose des Menschen. Wien. klin. Wschr. 34/231/1924.
- Löwenstein : Die Methodik der Reinkultur von Tuberkelbazillen aus dem Blute. Dtsch. kleine med. Wschr. 1930/1010.
- Lubenau : Zitat nach Gottsacker.
- Meyn : Mykobakterien der Milch. Der Lebensmitteltierarzt. 2. Jahrg. 177/1951.
- Mitscherlich - Reuß - Gürtürk : Der Einfluß der Vorbehandlung von tuberkulösem Material auf die Sicherheit des Nachweises von Tuberkelbakterien in Kultur- und Tierversuch. Zbl. f. Bakt. Orig. 158/97/1952.
- Mitscherlich : Die Ursache positiver Tuberkulinreaktionen bei Rindern mit tuberkulosefreiem Zerlegungsbefund. B.M.T.W. 66/105/1953.
- Mouriz : Ein Beitrag zur bakteriologischen Diagnostik der Tuberkulose. Klin. Wschr. 2249/1930.
- Munz : Untersuchungen über den Tuberkelbakteriengehalt kurzzeiterhitzter Molkereimilch mit Hilfe der Zentrifugiermethode, der Alkoholprobe und der Züchtung auf Petagnani-Nährboden modifiziert nach Witte. Inaug. Diss. Gießen 1949.
- Müller : Medizinische Mikrobiologie 1950.

Nocard-Roux: Zitat nach Gottsacker.

Orsechowski: Vergleichende Untersuchungen über die Züchtung des Tuberkelbazillus nach den Methoden Uhlenhuth und Hohn. Zbl. f. Bakt. Orig. 111/362/1929.

Otto, K. H.: Über die Züchtung von Tuberkelbakterien auf Malachitgrünnährboden nach Petragani. Inaug. Diss. Berlin 1938.

Pawlowsky: Zitat nach Gildemeister.

Petragnani: Einige zweckmäßige Modifikationen meines Nährbodens und meiner Technik zur Reinzüchtung der Kochschen Bazillen aus Sputum und anderem tuberkulösem Material. Boll. dell'ist. siero. terp. Milan 1926 ref. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 85/540/1927, Zbl. f. d. g. Tbc. Forschung 26/703/1927.

Petroff: A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces with the aid of sodium hydrate and gentian-violet-egg-meat-juice media. Zbl. Bakt. I. Ref. 63/519/1915.

Proskauer-Beck: Beiträge zur Ernährungsphysiologie des Tuberkelbazillus. Ztschr. f. Hyg. 18/128/1894.

Rolle und Mayer: Die Virulenz der Tuberkulosebakterien aus tuberkulösen Prozessen der alten Kühe. Die Rindertuberkulose. 2/127/1953.

Sander: Wachstum der Tuberkelbazillen auf pflanzlichen Nährböden. Arch. Hyg. 16/238/1893.

Schrader: Die Züchtung des Tuberkelbazillus nach der Methode von Hohn. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 102/163/1927.

Seelemann: Über hocherhitzte Milch. Die Kieler milchwirtschaftlichen Forschungsergebnisse Bd. 2, Heft 3, 1950.

Seelemann und Klingmüller: Die Züchtung von Tuberkelbakterien aus verschiedenen Ausgangsmaterialien mit Hilfe des sogenannten Säurebehandlungsverfahrens. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 104/482/1927.

Sonnenschein: Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrün-Einährböden. D.T.W. 38/115/1930.

Spengler: Tuberkelbakterienzüchtung aus Bakteriengemischen und Formaldehyddesinfektion. Ztschr. f. Hyg. u. Inf. 42/490/1903.

Steigner: Die bakteriologische Diagnose der Tuberkulose. Zbl. f. Bakt. Orig. 153/225/1949.

Steinbrecher: Vergleichende Züchtungsversuche von Tuberkelbakterien unter Verwendung von Sauton-Eigelb-Substrat nach Gottsacker und Petraganinährböden. Inaug. Diss. Gießen 1953.

- Sumiyoshi: Beitrag zur Reinzüchtung der Tuberkelbazillen aus dem Sputum. Ztschr. f. Tbc. 39/333/1924; 40/338/1924.
- Suranyi und Putnocky: Über die Leistungsfähigkeit des direkten Züchtungsverfahrens der Tuberkelbazillen nach Löwenstein-Sumiyoshi. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 94/401/1925.
- Viatschko: Die Brauchbarkeit des syrischen Goldhamsters als Versuchstier zum Tuberkulosenachweis. T.U. 4/243/1949.
- Witte: Beeinflussung der Kolonieform der Tuberkelbakterien des Typus bovinus durch Züchtung bei verminderter Sauerstoffspannung unter Berücksichtigung der Typenunterscheidung. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 139/279/1937.
- Wolters und Dehmel: Zur Züchtung und Differenzierung der Tuberkelbazillen. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 117/412/1930.
- Wolters und Dehmel: Über das Kulturverfahren zum Nachweis von Tuberkelbakterien besonders in Gesamtmilchproben. Ztschr. f. Inf. Krht. d. Haust. 39/102/1931.
- Uhlenhuth und Xylander: Zitat nach Otto K. H.

Ich bin Herrn Professor Dr. H. Keller für die Überlassung des Themas und für die rege Anteilnahme, womit er meine Arbeit verfolgte, zu herzlichstem Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Buss und Herrn Dr. Lang für ihre immer hilfsbereite Unterstützung.

F. Lebenslauf

Ich wurde am 6. Juli 1928 in Nanten/Siebenbürgen (Rumänien) als Sohn des Lehrers Paul Rist und dessen Ehefrau Gisela, geb. Kessenheimer, geboren.

Von 1935 bis 1939 besuchte ich die deutsche Volksschule in Nanten. Von September 1939 bis Juli 1940 war ich Schüler der rumänischen, ab 1940 der ungarischen Staatsschule, von September 1941 bis Juli 1943 aber des deutschen Gymnasiums in Karol/Siebenbürgen. Im September 1943 wechselte ich an das deutsche Obergymnasium in Bistritz-/Siebenbürgen über und verblieb dort bis Mai 1944. Infolge der Kriegsergebnisse mußte ich Siebenbürgen verlassen und besuchte vom Dezember 1944 bis Mai 1945 die Oberschule in Reichenberg/Sudetengau. Von Januar bis Juli 1946 war ich Schüler der Oberschule in Eferding/Osterreich. Im Schuljahr 1946/47 besuchte ich die Oberschule in Kempten/Allgäu und bestand hier am 17. Juli 1947 die Reifeprüfung. Im Wintersemester 1948/49 begann ich das tierärztliche Studium an der Justus Liebig-Hochschule in Gießen und legte im Oktober 1950 die tierärztliche Vorprüfung ab. Im Juli 1953 bestand ich die tierärztliche Prüfung ebenfalls in Gießen. Nach Ableistung des praktischen Halbjahres bei Herrn Dr. Heuer in Havixbeck/Westf. erhielt ich die Approbation. 1951 heiratete ich die Studienkollegin Ingeborg Seyfarth, die 1952 unter tragischen Umständen verstarb.



